



## مقاله پژوهشی

# غربالگری برخی ارقام تجاری زردآلوی ایران با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره با هدف شناسایی هم‌نامی‌ها

مهدی رضائی<sup>۱\*</sup> - میترا رحمتی<sup>۲</sup> - عبدالرضا کاوند<sup>۳</sup> - مرتضی همتی<sup>۴</sup> - سیدرضا کاظمی<sup>۵</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۹/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۰۱

## چکیده

در ایران، بسیاری از ارقام محلی زردآلو توسط باغ‌داران و نهال‌کاران با هدف بهره‌برداری از ارقام جدید در میان استان‌ها جابجا شده و متعاقباً در برخی موارد نام آن‌ها در مقصد تغییر یافته است. بنابراین برای مدیریت بهینه ژرم‌پلاسم زردآلوی کشور و شناسایی ارقامی که از نظر ژنتیکی از یکدیگر متفاوت هستند، غربالگری ژرم‌پلاسم زردآلو در ایران ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین هدف از انجام این مطالعه، غربالگری تعدادی از ارقام تجاری زردآلوی ایران با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره، جهت بررسی وضعیت نام‌های اطلاق شده به ارقام، شناسایی هم‌نامی‌ها و درک بهتر از تفاوت‌های ژنتیکی میان ارقام بود. در این مطالعه ۲۹ رقم مختلف زردآلو با پنج تکرار از ۱۴ نهالستان از شش استان کشور جمع‌آوری شدند. برای ارزیابی وضعیت حفظ اصالت ژنتیکی در نهالستان‌های کشور، برخی از ارقام، دو بار از نهالستان‌های مختلف جمع‌آوری شدند. همچنین DNA ۱۰ رقم بومی زردآلو که قبلاً ثبت و در فهرست ملی ارقام وارد شده بودند نیز به عنوان شاهد در مطالعه گنجانده شدند. علاوه بر آن زردآلوی رقم Orange Red (با نام محلی پرتقالی) به عنوان نمونه Outgroup در این بررسی‌ها گنجانده شد. برای انجام آزمایشات، استخراج DNA به روش CTAB انجام و از ۱۳ جفت آغازگر ریزماهواره که در مطالعات مختلف بیشترین میزان تنوع را آشکار کرده بودند، برای انجام واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز استفاده شد. سپس محصولات این واکنش‌ها بر روی ژل پلی‌اکریلامید ده درصد الکتروفورز شد. نتایج نشان داد که شاخص‌های تنوع ژنی نی و شانون به ترتیب ۰/۳۲ و ۰/۴۸ بودند. بیشترین فاصله ژنتیکی (۰/۷۴) میان ارقام عسگرآبادی و زودرس و همچنین ارقام محلی گوشتی زودرس و نصیری مشاهده شد. در این مطالعه، برخی از ارقام علی‌رغم داشتن اسامی متفاوت، دارای زمینه ژنتیکی مشابهی بودند. همچنین نتایج نشان داد که ارقام نصیری، طبرزه و شاهرودی که هر کدام از دو نهالستان از استان‌های متفاوت جمع‌آوری شده بودند، علی‌رغم نام یکسان دارای زمینه ژنتیکی متفاوتی بودند. در نهایت می‌توان گفت که یکی از چالش‌های جدی در مدیریت ژرم‌پلاسم و نهالستان‌های کشور، عدم وجود باغات مادری استاندارد از ارقام اصیل بومی زردآلو جهت تامین پیوندک‌های سالم و اصیل برای نهالستان‌ها می‌باشد.

## واژه‌های کلیدی: تجزیه خوشه‌ای، مدیریت ژرم‌پلاسم، نشانگر مولکولی، هم‌نامی

## مقدمه

می‌باشد که در مناطق دارای آب و هوای مدیترانه‌ای پرورش داده می‌شود (۵ و ۱۵). گونه‌های زردآلو به شش گروه اکو-جغرافیایی، شامل آسیای مرکزی، شرق چین، شمال چین، Dzhungar-Zailij، ایرانی-قفقازی و اروپایی تقسیم‌بندی شده‌اند (۹). ژنوتیپ‌های ایرانی زردآلو که متعلق به گروه ایرانی-قفقازی هستند، عمدتاً خودناسازگار بوده و دارای نیاز سرمایی کمی می‌باشند (۵). احتمالاً، سطح بالای تنوع ژنتیکی در زردآلوهای ایران به دلیل تکثیر جنسی آن‌ها طی سالیان متمادی از طریق بذر است.

بر اساس میانگین تولید از سال ۲۰۰۸ تا ۲۰۱۸، ایران سومین تولیدکننده زردآلو در جهان پس از ترکیه و ازبکستان می‌باشد. میزان

زردآلو (*Prunus armeniaca* L.) به عنوان یکی از مهم‌ترین درختان میوه متعلق به زیرخانواده آمیگدالوئیده از خانواده رزاسه

۱ و ۲- استادیاران، مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، کرج، ایران  
(\*)- نویسنده مسئول: Email: meh.rezaee@areeo.ac.ir

۳، ۴ و ۵- محققین غیر هیأت علمی، مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، کرج، ایران

تولید زردآلو در ایران در سال ۲۰۱۸، ۳۴۲۴۷۹ تن گزارش شده است (۲).

در ایران، با توجه به عدم وجود یک سیستم مشخص برای صیانت از هویت ارقام گیاهی، بسیاری از ارقام بومی بین استان‌ها جابجا شده و متعاقباً در برخی موارد، نام رقم در مقصد، طی سالیان دچار تغییر شده است. انتظار می‌رود که در ژرمپلاسم زردآلوی ایران، چهار گروه از مواد گیاهی وجود داشته باشد. ۱- ژنوتیپ‌هایی که دارای زمینه ژنتیکی متفاوت و نام‌های متفاوت هستند. ۲- ژنوتیپ‌هایی که دارای زمینه ژنتیکی متفاوت و نام‌های یکسان هستند. ۳- ژنوتیپ‌هایی که دارای زمینه ژنتیکی یکسان و نام‌های متفاوت هستند. ۴- ژنوتیپ‌هایی که دارای زمینه ژنتیکی یکسان و نام‌های یکسان هستند. بنابراین برای تعیین ارقامی که واقعا از نظر ژنتیکی با یکدیگر متفاوت هستند، تعیین هم‌نامی‌ها و در نهایت مدیریت بهینه ژرمپلاسم، غربالگری ژرمپلاسم زردآلو در ایران و جمع‌آوری اطلاعات ریخت‌شناختی آن‌ها ضروری است.

امروزه استفاده از نشانگرهای مولکولی برای ارزیابی تنوع و روابط ژنتیکی و همچنین مدیریت ژرمپلاسم و استفاده از آن در برنامه‌های به‌نژادی ضروری به‌نظر می‌رسد. علاوه بر این، انگشت‌نگارهای ایجاد شده با استفاده از نشانگرهای مولکولی می‌تواند در قالب برنامه‌های صدور گواهی برای حفاظت از حقوق به‌نژادگر و معرفی ارقام گیاهی جدید، مورد استفاده قرار گیرند (۱۶). چندشکلی و تکرارپذیری بالا، مستقل بودن از محیط و توزیع گسترده در ژنوم، نشانگرهای SSR را به یکی از نشانگرهای مطلوب در مطالعات ژنتیکی بدل نموده است (۱۳ و ۱۷). همباز بودن و تنوع بسیار بالای نشانگرهای ریزماهواره در سطح گونه، از ویژگی‌هایی است که این نشانگر را برای مطالعاتی نظیر تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای، شناسایی ارقام و تعیین قرابت آن‌ها مناسب ساخته است (۱۲). از نشانگرهای ریزماهواره به‌طور گسترده‌ای برای تعیین ویژگی‌های مولکولی و شناسایی ارقام در گونه‌های مختلف جنس پرونوس از جمله *P. armeniaca* استفاده شده است (۴، ۸، ۱۰، ۱۳، ۱۴، ۱۶ و ۱۸).

در مطالعات زیادی از نشانگرهای مولکولی برای شناسایی هم‌نامی‌ها و مدیریت بهینه ژرمپلاسم استفاده شده است. گراس و همکاران (۳) با هدف مدیریت بهینه ژرمپلاسم سیب، ۱۱۳۱ ژنوتیپ دیپلوئید *Malus domestica* را با ۱۹۱۰ نمونه وحشی و اهلی با هدف شناسایی نمونه‌های دارای زمینه ژنتیکی یکسان با ۹ جفت آغازگر SSR مورد مقایسه قرار دادند. آبوکورکو و همکاران (۱) از نشانگرهای SNP برای شناسایی هم‌نامی‌ها در ژرمپلاسم کاساوا استفاده کردند. در این مطالعه ۲۳۷۱ ژنوتیپ با استفاده از ۲۰۷۱۲ SNP مورد بررسی قرار گرفت. تروچیلو و همکاران (۱۹) از ۳۳ نشانگر SSR و ۱۱ ویژگی مورفولوژیکی اندوکارب زیتون برای بررسی ۸۸۴ درخت از ۴۹۹ ژنوتیپ از ۲۱ کشور استفاده کردند. خدری و همکاران

(۷) از نشانگرهای RAPD برای بررسی ۱۰۰ ژنوتیپ موجود در کلکسیون زیتون استفاده کردند. در این مطالعه ۴۹۷ درخت زیتون با استفاده از ۳۲ نشانگر RAPD مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به آنچه گفته شد، در این مطالعه برخی ارقام تجاری زردآلوهایی که در نهالستان‌ها تکثیر می‌شوند، از شش استان و ۱۴ نهالستان جمع‌آوری شد و با نشانگرهای ریزماهواره مورد بررسی قرار گرفت. هدف از انجام این مطالعه، غربالگری تعدادی از ارقام تجاری زردآلوی ایران با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره، جهت بررسی وضعیت نام‌های اطلاق شده به ارقام، شناسایی هم‌نامی‌ها و درک بهتر از تفاوت‌های ژنتیکی میان ارقام بود.

## مواد روش‌ها

### مواد گیاهی

در این مطالعه ۲۹ رقم زردآلو با پنج تکرار از ۱۴ نهالستان از شش استان ایران جمع‌آوری و به گلخانه موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال منتقل شدند (جدول‌های ۱ و ۲). برای ارزیابی وضعیت رعایت اصالت ژنتیکی در نهالستان‌های کشور، برخی از ارقام شامل شاهرودی، عسگرآبادی، نصیری، جهانگیری، سلطنتی، رجبعلی، طبرزه، شاملو و شمس دو بار از نهالستان‌های مختلف جمع‌آوری شدند. بنابراین مجموعاً ۳۸ نمونه با ۵ تکرار (۱۹۰ اصله نهال) جمع‌آوری شد. همچنین DNA ۱۰ رقم بومی که قبلاً ثبت و در فهرست ملی ارقام وارد شده بودند (شامل اردوباد، شکرپاره، درشت ملایر، قربان مراغه، نصیری، شاهرودی، شمس، لاسگردی، باقری و نادری) نیز به عنوان شاهد در مطالعه گنجانده شد. برای پی بردن به کارایی نشانگرهای استفاده شده در مطالعه رقم Orange Red (با نام محلی پرتقالی) به عنوان نمونه Outgroup در این بررسی‌ها گنجانده شد.

### استخراج DNA و PCR

از برگ‌های سالم و جوان هر رقم نمونه برداری انجام و نمونه‌ها به فریز -۷۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. نمونه‌های برگی با استفاده از هاون و ازت مایع پودر شدند. از بافر استخراج Tris 100 mM, NaCl 1.4 M, EDTA, 20mM, CTAB 2%, DTT 30mM برای استخراج اسید نوکلئیک استفاده شد (۱۶). کمیت و کیفیت اسید نوکلئیک استخراج شده با استفاده از اسپکتروفتومتری (NanoDrop 1000) و الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد ارزیابی شد. رقیق‌سازی نمونه‌ها با استفاده از آب دیونیزه عاری از DNase تا غلظت ۲۰ نانوگرم در میکرولیتر انجام شد.

جدول ۱- محل نمونه‌برداری، تعداد رقم جمع‌آوری شده در هر محل و تعداد نهالستان‌های هر استان که ارقام محلی زردآلو از آن‌ها جمع‌آوری شد

Table 1- Sampling location, number of cultivar per location and number of nurseries per location which apricot local cultivars were sampled

استان Province	تعداد رقم جمع‌آوری شده Number of cultivar	تعداد نهالستان مورد نمونه‌برداری Number of nurseries
West Azarbaijan	8	2
East Azarbaijan	8	5
Esfahan	8	2
Semnan	9	2
Alborz	4	2
Tehran	1	1
تعداد کل Total	38	14

جدول ۲- شماره لیبل، نام رقم و محل نمونه‌برداری هر رقم زردآلو

Table 2- Label number, cultivar names and sampling location of each apricot cultivar

شماره لیبل Label number	رقم Cultivar	محل نمونه‌برداری Sampling location	شماره لیبل Label number	رقم Cultivar	محل نمونه برداری Sampling location
1 to 5	Mahali Goshti zodras	East Azarbaijan	98-102	Pishrase bazri	Alborz
6 to 10	Asgar abadi	East Azarbaijan	103-106+108	Portaghali	West Azarbaijan
11 to 15	Mahali ghermez Ananasi	East Azarbaijan	107	Shahroudi	West Azarbaijan
16 to 20	Shahroudi	West Azarbaijan	109	Tokhm Gerdi	Esfahan
21 to 25	Nasiri	West Azarbaijan	110-114	Dir Ras	Alborz
26 to 30	Saltanati	Esfahan	115-119	Shahroudi	Tehran
31 to 35	Nasiri	East Azarbaijan	120 to 124	Asgar Abadi	West Azarbaijan
36 to 39	Shamlou	East Azarbaijan	125 to 129	Soltani	West Azarbaijan
40 to 44	Eivand	East Azarbaijan	130 to 134	Jahangiri	Semnan
45 to 49	Tabarze	East Azarbaijan	135 to 139	Ghavami	Semnan
50 to 54	Mahali Ghermez Anari	East Azarbaijan	142 to 144	Tabarze	West Azarbaijan
55 to 59	Nakhjavan	Alborz	145 to 149	Shamlou	West Azarbaijan
60 to 62	Saltanati	Esfahan	150 to 154	Manouchehri	Semnan
64,65,67	Asefi	Esfahan	155 to 159	Daneshkade	Semnan
68 to 72	Nouri	Esfahan	160 to 164	Rajab Ali	Semnan
73 to 77	Rajab Ali	Esfahan	165 to 169	Zoudras	West Azarbaijan
78+80 to 82	Shams	Esfahan	170 to 174	Zaferani	Semnan
83 to 87	Shams	Alborz	175 to 179	Jafari	Semnan
88 to 92	Jahangiri	Esfahan	180 to 184	Khabei	Semnan
93 to 97	Tokhm Gerdi	Esfahan	185 to 189	Ghiasi	Semnan

### الکتروفورز و آنالیز داده‌ها

محصولات PCR بر روی ژل عمودی پلی‌اکریلامید ۱۰ درصد و در بافر (1x) TBE الکتروفورز شدند. از رنگ ژل رد<sup>۱</sup> (شرکت BIOTIUM) برای رنگ‌آمیزی ژل و از نور UV (طول موج ۳۰۰ نانومتر) برای آشکارسازی باندها استفاده شد. از نشانگر اندازه جفت باز شرکت سیناژن (PR911653) برای مشخص کردن اندازه باندها استفاده شد. هشت جفت نشانگر -UDP98-003, UDP98-021, UDP98-024, Ps12a2, UDP98-409, UDP98-411, UDP98-412, and UDP98-416 که بیشترین میزان چندشکلی را نشان می‌دادند انتخاب و نمره‌دهی شدند.

واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۱۵ میکرولیتر و با استفاده از مسترمیکس (1x)، آغازگرهای پیش‌رو و پس‌رو (0.2 pmol) آب عاری از DNase و ۵۰ نانوگرم اسید نوکلئیک انجام شد. با توجه به اینکه شناسایی دقیق نمونه‌هایی که دارای زمینه ژنتیکی یکسانی هستند، مستلزم استفاده از جایگاه‌های ژنومی دارای تنوع قابل توجه است (۳)، آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه بر اساس بیش‌ترین میزان چندشکلی و تعداد آل‌های تکثیر شده در مطالعات قبلی (۵، ۸، ۱۴، ۱۶ و ۱۸) انتخاب شدند (جدول ۳). واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز در دستگاه ترموسایکلر (Mastercycler® pro 6325) و به صورت یک مرحله ۹۴ درجه سلسیوس ۴ دقیقه، ۳۰ چرخه: ۹۴ درجه سلسیوس ۳۰ ثانیه، دمای اتصال هر جفت آغازگر، ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سلسیوس، ۳۰ ثانیه و یک مرحله ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام شد.

جدول ۳- نام و مشخصات آغازگرهای مورد استفاده برای تعیین ویژگی‌های مولکولی برخی ارقام تجاری زردآلوی ایران

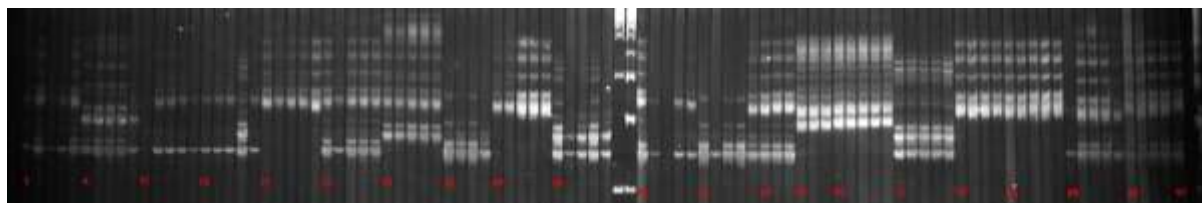
Table 3- Characteristics of primer pairs used for evaluation of molecular characteristics in some Iranian commercial apricot cultivars

شماره Number	نام آغازگر Primer name	توالی آغازگر Primer sequence	دمای اتصال آغازگر Annealing Temperature (°C)
1	UDP98-024-F UDP98-024-R	CCTTGATGCATAATCAAACAGC GGACACACTGGCATGTGAAG	58
2	UDP98-416-F UDP98-416-R	TTTTCTCAGCAGCCAAACAA ATGTTTCGTGCTTCTGCTCC	58
3	UDP98-021-F UDP98-021-R	AAGCAGCAATTGGCAGAATC GAATATGAGACGGTCCAGAAGC	59
4	UDP98-412-F UDP98-412-R	AGGGAAAGTTTCTGCTGCAC GCTGAAGACGACGATGATGA	58
5	UDP96-003-F UDP96-003-R	TTGCTCAAAAGTGTGCTTGC ACACGTAGTGCAACACTGGC	58
6	UDP96-008-F UDP96-008-R	TTGTACACACCCTCAGCCTG TGCTGAGGTTTCAGGTGAGTG	60
7	UDP98-405-F UDP98-405-R	ACGTGATGAACTGACACCCA GAGTCTTTGCTCTGCCATCC	59
8	ASSR72-F ASSR72-R	AAGTGGGATTGGTAGGGAGGAAG CTACGGAGCCAGTTGAGAAAAG	62
9	UDP98-409-F UDP98-409-R	GCTGATGGGTTTTATGGTTTTTC CGGACTCTTATCCTCTATCAACA	59
10	UDP97-401-F UDP97-401-R	TAAGAGGATCATTTTTTGCCTTG CCCTGGAGGACTGAGGGT	58
11	UDP96-019-F UDP96-019-R	TTGGTCATGAGCTAAGAAAACA TAGTGGCACAGAGCAACACC	58
12	UDP98-411-F UDP98-411-R	AAGCCATCCACTCAGCACTC CCAAAAACCAAAACCAAAGG	56
13	Ps12a2-F Ps12a2-R	GCCACCAATGGTTCTTCC AGCACCAGATGCACCTGA	56

### نتایج و بحث

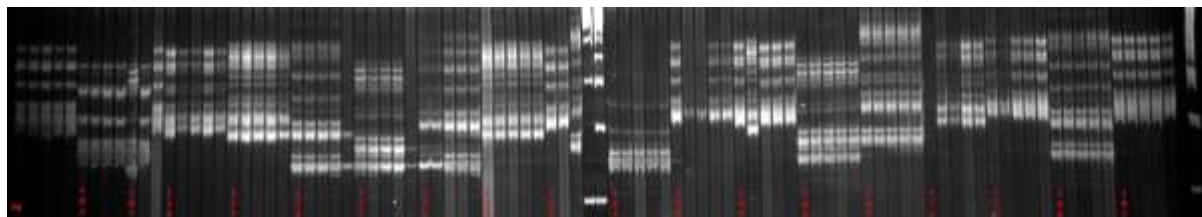
هشت نشانگر در مجموع ۱۲۴ آلل تکثیر کردند و میانگین تعداد آلل به ازای هر جایگاه ۱۵/۵ بود. تصاویر مربوط به برخی از ژل‌های الکتروفورز در قسمت زیر نشان داده شده است (شکل‌های ۱ تا ۴). بر اساس شاخص‌های محاسبه شده، توانمندترین نشانگر در شناسایی تنوع میان ارقام، نشانگر UDP98-409 بود (شکل‌های ۱ و ۲) و کم‌ترین میزان تنوع توسط نشانگر UDP96-003 شناسایی شد (جدول ۴).

آلل‌های چندشکل به صورت ۱ برای حضور باند و صفر برای عدم حضور باند نمره‌دهی شدند. برای شناسایی نمونه‌های خارج از تیپ، ۱۸۴ نمونه مورد بررسی با استفاده از روش Paired Group و الگوریتم اقلیدسی با استفاده از نرم‌افزار PAST گروه‌بندی شدند. سپس داده‌های مربوط به نمونه‌های خارج از تیپ از مجموعه داده‌ها حذف و گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها مجدداً به روش قبل انجام شد. آنالیز تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) با استفاده از نرم‌افزار PAST انجام و شاخص‌های تنوع ژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار Popgene 32 ارزیابی شد.



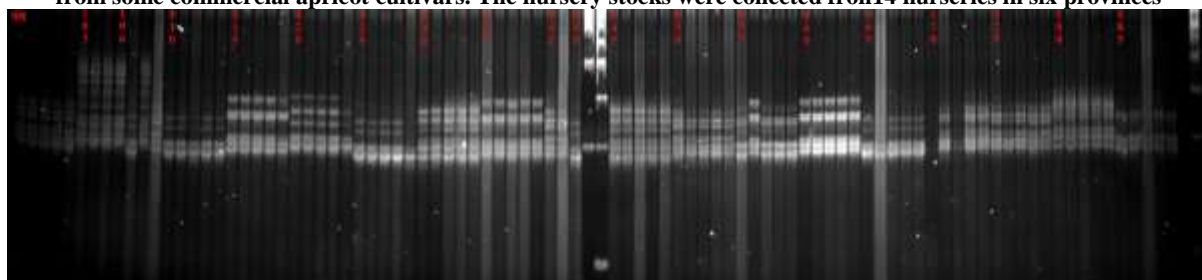
شکل ۱- تصویر ژل الکتروفورز محصولات PCR مربوط به آغازگر UDP98-409 بر روی نمونه‌های شماره ۱ تا ۹۷ ارقام تجاری زردآلوی جمع‌آوری شده از ۱۴ نهالستان در شش استان ایران

Figure 1- Electrophoresis gel of PCR products derived from UDP98-409 primer pairs on 1 to 97 DNA samples extracted from some commercial apricot cultivars. The nursery stocks were collected from 14 nurseries in six provinces



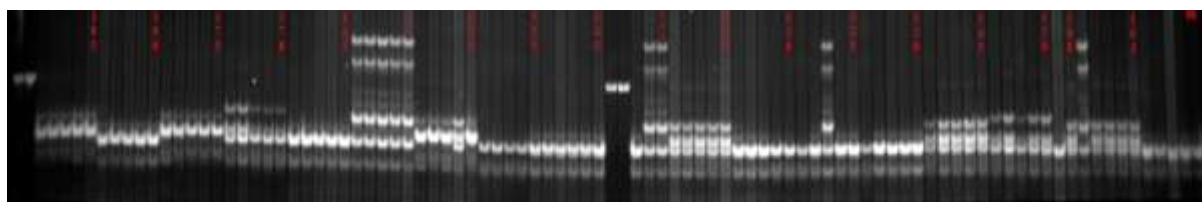
شکل ۲- تصویر ژل الکتروفورز محصولات PCR مربوط به آغازگر UDP98-409 بر روی نمونه‌های شماره ۹۸ تا ۱۸۴ ارقام تجاری زردآلوی جمع‌آوری شده از ۱۴ نهالستان در شش استان ایران

Figure 2- Electrophoresis gel of PCR products derived from UDP98-409 primer pairs on 98 to 184 DNA samples extracted from some commercial apricot cultivars. The nursery stocks were collected from 14 nurseries in six provinces



شکل ۳- تصویر ژل الکتروفورز محصولات PCR مربوط به آغازگر UDP96-003 بر روی نمونه‌های شماره ۹۸ تا ۱۸۴ ارقام تجاری زردآلوی جمع‌آوری شده از ۱۴ نهالستان در شش استان ایران

Figure 3- Electrophoresis gel of PCR products derived from UDP96-003 primer pairs on 98 to 184 DNA samples extracted from some commercial apricot cultivars. The nursery stocks were collected from 14 nurseries in six provinces



شکل ۴- تصویر ژل الکتروفورز محصولات PCR مربوط به آغازگر UDP98-416 بر روی نمونه‌های شماره ۹۸ تا ۱۸۴ ارقام تجاری زردآلوی جمع‌آوری شده از ۱۴ نهالستان در شش استان ایران

Figure 4- Electrophoresis gel of PCR products derived from UDP98-416 primer pairs on 98 to 184 DNA samples extracted from some commercial apricot cultivars. The nursery stocks were collected from 14 nurseries in six provinces

مقولی و همکاران (۱۰) ۱۳۳ رقم زردآلو و سه گونه خویشاوند که خاستگاه‌های جغرافیایی متفاوتی را داشتند را با ۱۰ نشانگر که چند شکلی نشان دادند، مطالعه کردند. در مجموع ۱۳۳ آلل با میانگین ۱۳/۳ آلل به ازای هر جایگاه تکثیر شد. میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده برای هر جایگاه از ۰/۸۶۳ تا ۰/۳۱۸ متغیر بود. گروه‌بندی ارقام با روش Paired Group و با استفاده از ماتریس فاصله‌نی نشان داد که ارقام آسیای مرکزی در دندروگرام جایگاه مجزایی را به خود اختصاص دادند. بیشتر ارقام اروپای شرقی با یکدیگر در یک خوشه قرار گرفتند و تعداد اندکی هم‌نامی نیز در میان آن‌ها یافت شد.

میانگین شاخص‌های تنوع ژنی نی و شانون به ترتیب ۰/۳۲ و ۰/۴۸ بود (جدول ۴) که مقایسه این شاخص‌ها با اعداد متناظر در مطالعه تیان مینگ و همکاران (۱۹) نشان می‌دهد که تنوع بالایی در مجموعه ارقام این مطالعه وجود داشت. مینگ و همکاران (۱۹) ساختار ژنتیکی زردآلوهای وحشی موجود در دره ایلی در غرب چین را با نشانگرهای SSR مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه ۸ جفت نشانگر SSR، ۱۸۵ باند تکثیر کردند که از این تعداد ۱۵۳ باند چند شکلی داشتند. نتایج آن‌ها نشان داد که نشانگرهای SSR ابزاری کارا برای بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیت زردآلوهای وحشی بود. در این مطالعه شاخص‌های تنوع ژنی نی و شانون به ترتیب ۰/۲۸۷ و ۰/۴۵۸ بود و این نشان داد که زردآلوی‌های وحشی موجود در این دره دارای تنوع ژنتیکی بالایی بودند.

جدول ۴- شاخص‌های تنوع ژنتیکی حاصله از آنالیز ۸ جایگاه ژنومی SSR در برخی ارقام تجاری زردآلوی ایران

Table 4- Genetic diversity indexes resulted from analysis of 8 SSR loci in some Iranian commercial apricot cultivars

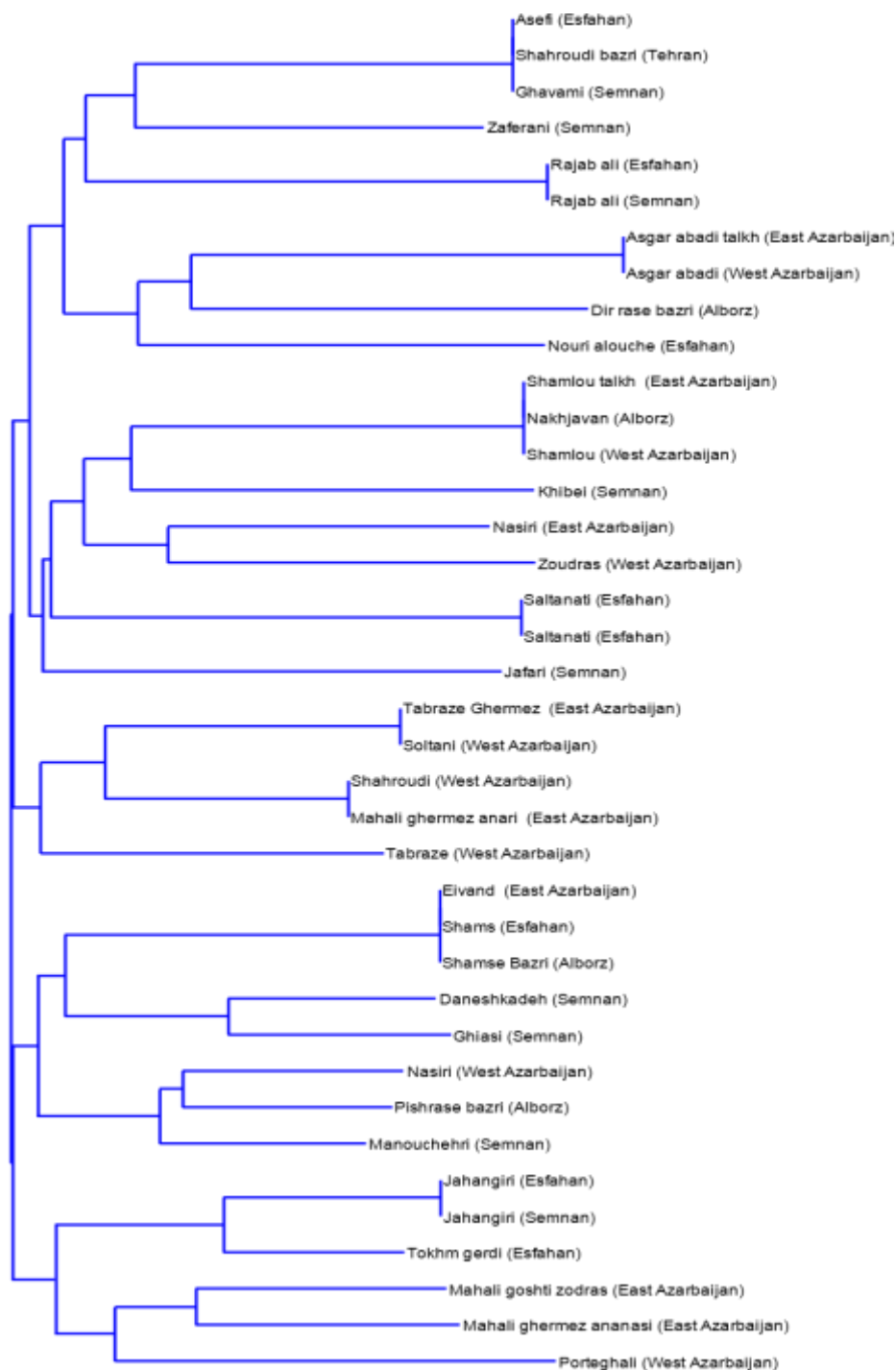
نام جایگاه Locus name	تعداد آل مشاهده شده Number of observed alleles	تعداد آل موثر Number of effective alleles	شاخص تنوع ژنی نی Nei's gene diversity	شاخص اطلاعاتی شانون Shannon's information index
UDP96-003	1.92	1.36	0.22	0.36
UDP98-021	2	1.59	0.35	0.53
UDP98-024	2	1.44	0.26	0.41
Ps12a2	1.92	1.50	0.30	0.45
UDP98-409	2	1.69	0.39	0.57
UDP98-411	2	1.59	0.35	0.52
UDP98-412	2	1.60	0.36	0.54
UDP98-416	1.94	1.53	0.31	0.46

اساس آغازگرهای مورد استفاده بودند.

گروه‌بندی ۱۹۰ نمونه مورد بررسی در مطالعه حاضر نشان داد که برخی از نمونه‌ها شامل شماره‌های ۱۹ و ۱۰۷ (در رقم شاهرودی)، ۵۹ (در رقم نخجوان)، ۱۲۷ (در رقم سلطانی)، ۱۳۷ (در رقم قوامی)، ۱۴۴ (در رقم طبرزه) و ۱۵۶ (در رقم دانشکده) الگوی باندی متفاوتی (حداقل در یک جایگاه) با بقیه اعضای گروه خود داشتند و بنابراین به عنوان نمونه خارج از تیپ، شناخته شدند (نتایج نشان داده نشده است). برای شناسایی هم‌نامی‌ها ابتدا داده‌های مربوط به نمونه‌های خارج از تیپ از مجموع داده‌ها حذف شد. سپس گروه‌بندی نمونه‌ها مجدداً انجام شد و نتایج نشان داد که برخی از ارقام، علی‌رغم نام متفاوت دارای زمینه ژنتیکی مشابهی بودند (شکل ۵). بنابراین نام آن‌ها پس از بررسی ویژگی‌های میوه و تایید نتایج مولکولی با استفاده از صفات مورفولوژیک بایستی در ژرمپلاسزم زردآلو یکسان‌سازی شود. البته بدیهی است که برای تایید نتایج به دست آمده در این مطالعه، بررسی ویژگی‌های میوه و دیگر خصوصیات مورفولوژیکی که زیاد تحت تاثیر محیط نیستند در مطالعات بعدی ضروری است. ولی بر اساس نتایج فعلی، وجود ژنوتیپ‌های دارای زمینه ژنتیکی یکسان و نام‌های متفاوت، نشان می‌دهد که بر اثر جابجایی مواد گیاهی از استانی به استان دیگر و یا از فرهنگی به فرهنگ دیگر نام آن توسط باغداران و یا نهال‌کاران به مرور زمان دچار تغییر شده است. همچنین دندروگرام ترسیم شده نشان داده که نشانگرهای مورد استفاده به خوبی قادر به تفکیک رقم پرتقالی (Orang Red) که منشاء وارداتی دارد از ارقام ایرانی بودند (شکل ۵) و این نتیجه بیانگر انتخاب نشانگرهای مناسب و دارای چندشکلی بالا برای غربالگری ارقام زردآلوی ایرانی بود.

نمودار ترسیم شده بر اساس بردار اول و دوم در آنالیز تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) نشان داد که ۳۸ نمونه جمع‌آوری شده مورد بررسی به احتمال زیاد ۲۶ رقم متفاوت بودند (شکل ۶).

پدربیک و همکاران (۱۳) از هشت نشانگر SSR برای بررسی ۷۷ رقم زردآلوی متعلق به پنج گروه جغرافیایی مختلف شامل چین، آسیا، آمریکای شمالی، مدیترانه و اروپای غربی و مرکزی استفاده کردند. شش جفت آغازگر از هشت جفت آغازگر مورد استفاده چندشکلی نشان دادند و ۷۱ آل با میانگین ۱۱/۸۳ آل در هر جایگاه تکثیر کردند. در این مطالعه زردآلوهایی چینی بیش‌ترین آل را به خود اختصاص دادند. ارقام آسیایی، آمریکای شمالی و اروپای غربی تعداد آل کمتری نسبت به ارقام چینی داشتند و ارقام اروپای مرکزی دارای کم‌ترین میزان آل بودند. میزان اندک آل‌های تکثیر شده در ارقام اروپای مرکزی، حاکی از تنوع ژنتیکی بسیار محدود در این ارقام بود. ماتریس فاصله ترسیم شده بر اساس تنوع ژنی نی نشان داد که بیشترین فاصله ژنتیکی (۰/۷۴) میان ارقام عسگرآبادی و زودرس و همچنین محلی گوشتی زودرس و نصیری وجود داشت. جنتی زاده و همکاران (۶) رقم و ژنوتیپ ایرانی زردآلو را با استفاده از صفات مورفولوژیک و نشانگرهای مولکولی RAPD مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه از ۹۷ آغازگر مورد استفاده، ۱۷ آغازگر چندشکلی نشان دادند. این ۱۷ آغازگر در مجموع ۱۷۲ قطعه تکثیر کردند. نتایج حاصل از ترسیم ماتریس شباهت در این بررسی نشان داد که کم‌ترین شباهت (۰/۳۰) بین ژنوتیپ‌های تنسگل و شاهرود ۴۸ و بیشترین شباهت میان ارقام نوری پیش‌رس و نوری دیررس وجود داشت. همچنین ارقام قربان مراغه و استیوت مراغه به همراه رقم قاضی جهان تشابه بالایی را نشان دادند (۰/۸۹ تا ۰/۹۳). محمدزاده و همکاران (۱۱) تنوع ژنتیکی را در ۳۰ رقم و ژنوتیپ زردآلوی ایرانی و ۲ رقم خارجی به عنوان شاهد با استفاده از صفات مورفولوژیک و نشانگر RAPD مورد ارزیابی قرار دادند. در این مطالعه نشانگرهای مورفولوژیک قادر به جدا کردن ارقام خارجی بلغاری و کانی‌نو از ارقام و ژنوتیپ‌های ایرانی نبودند در حالی که نشانگرهای مولکولی رقم بلغاری را به وضوح از ارقام ایرانی تفکیک کرد. بر اساس دندروگرام ترسیم شده در این مطالعه، ژنوتیپ‌های شاهرود ۳۲ و ۳۳ دارای زمینه ژنتیکی یکسانی بر

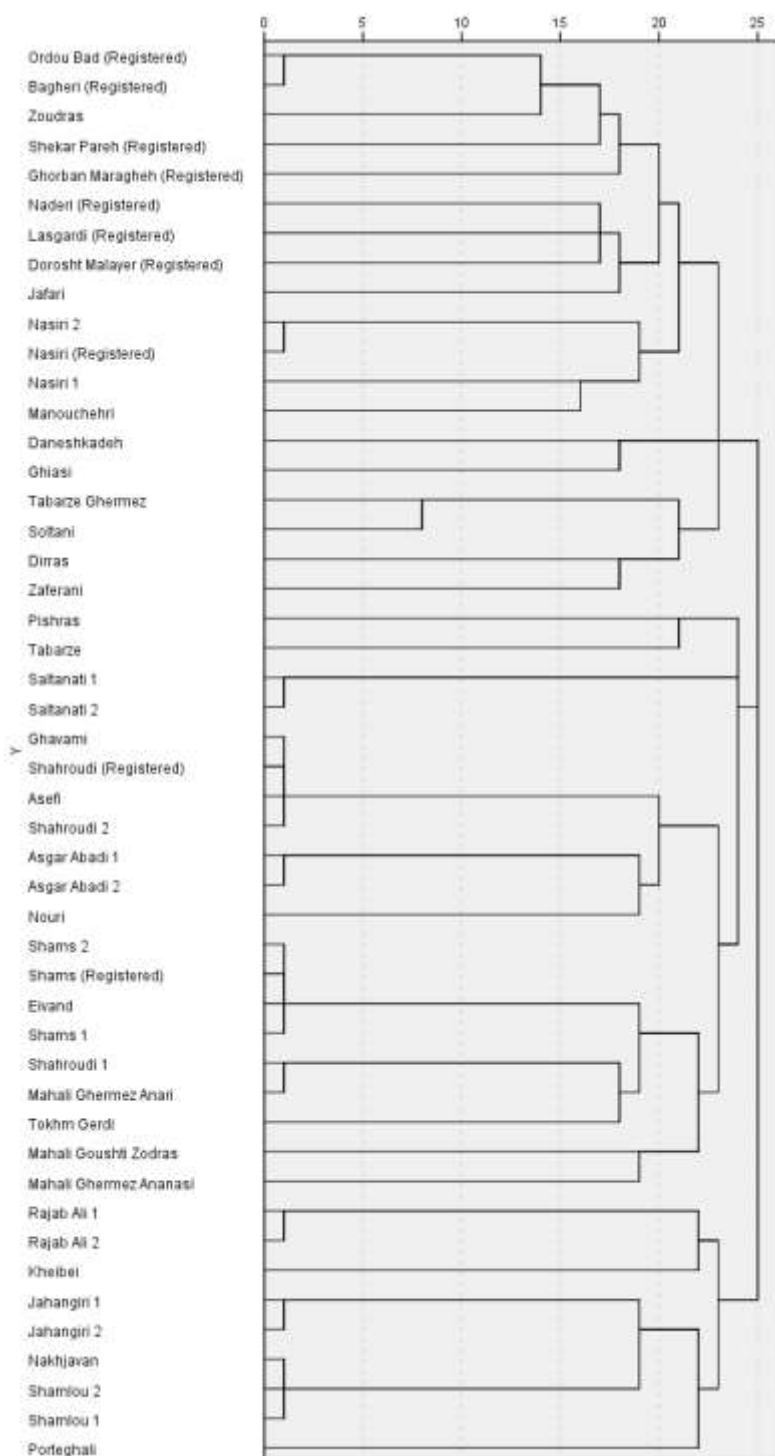


شکل ۵- تجزیه خوشه‌ای ۲۹ رقم زردآلوی ایرانی بر اساس داده‌های حاصل از ۸ جایگاه SSR شامل (UDP96-003, UDP98-021, UDP98-024, Ps12a2, UDP98-409, UDP98-411, UDP98-412, and UDP98-416). Local varieties names and sampling locations (in the parenthesis) are represented in the figure.

شکل ۵- تجزیه خوشه‌ای ۲۹ رقم زردآلوی ایرانی بر اساس داده‌های حاصل از ۸ جایگاه SSR شامل (UDP96-003, UDP98-021, UDP98-024, Ps12a2, UDP98-409, UDP98-411, UDP98-412, and UDP98-416). Local varieties names and sampling locations (in the parenthesis) are represented in the figure.







شکل ۷- دندروگرام ترسیم شده (در فاصله ژنتیکی صفر تا ۲۴) بر اساس داده‌های حاصل از نشانگرهای SSR در ارقام جمع‌آوری شده از نهالستان‌ها و ارقام ثبت شده در فهرست ملی ارقام (شامل اردوباد، شکرپاره، درشت ملایر، قربان مراغه، نصیری، شاهرودی، شمس، لاسگردی، باقری و نادری)

Figure 7- Depicted dendrogram (genetic distance from 0 up to 24) based on SSR data of apricot cultivars collected from nurseries and registered apricot cultivars in national list (including Urdoabad, Shekarpahre, Dorosht Malayer, Ghorban Maragheh, Nasisri, Shahrودي, Shams, Lasgerdi, Bagheri and Naderi)

نشانگرهای SSR مورد استفاده در این مطالعه نشان داد که سه جایگاه UDP98-021، UDP98-409 و UDP98-411 با توجه به تنوع بالای آلل‌های تکثیر شده قادر به تفکیک ۲۶ رقم زردآلو بودند.

### نتیجه‌گیری

شناسایی نمونه‌های خارج از تیپ در میان پنج تکرار متعلق به برخی از ارقام علی‌رغم تکثیر غیر جنسی آن‌ها می‌تواند ناشی از اشتباه در مرحله جابجایی، الصاق لیبل و یا انتخاب اشتباه پیوندک در نهالستان‌ها باشد. همچنین وجود هم‌نامی‌ها در ژرم‌پلاسم و متفاوت بودن زمینه ژنتیکی ارقام دارای نام مشابه، نشان می‌دهد که جهت حفظ اصالت ژنتیکی و جلوگیری از تعدد نام‌ها در ارقام (و همچنین بالا بردن کیفیت و کمیت تولید زردآلو) ایجاد زنجیره تولید نهال گواهی شده شامل هسته‌های اولیه و باغات مادری جهت تامین پیوندک‌های دارای اصالت و سلامت، ضروری می‌باشد.

در این مطالعه علاوه بر تایید ۱۵ مورد هم‌نامی که در مطالعات قبلی مشخص شده بود، ۳۷ مورد هم‌نامی دیگر نیز شناسایی شد. در پژوهشی که توسط خدیری و همکاران (۷) بر روی درخت زیتون با استفاده از نشانگر RAPD انجام شد، موارد زیادی از اشتباه در لیبل-گذاری، هم‌نامی و نام‌های مشابه یافت شد.

مقایسه الگوی باندی ارقام مورد بررسی با الگوی باندی حاصل از ارقامی که قبلاً ثبت شده و در فهرست ملی ارقام گیاهی درج شده‌اند (شکل ۷) نشان داد که این ارقام از ارقام جمع‌آوری شده در این مطالعه از لحاظ ژنتیکی مجزا بودند. مقایسه الگوی باندی ارقام شمس، نصیری و شاهرودی که از نهالستان‌ها جمع‌آوری شده بودند با ارقام ثبت شده (به عنوان شاهد) نشان داد که در مورد ارقام نصیری و شاهرودی که هر کدام دوبار از نهالستان‌های مختلف جمع‌آوری شده بودند، فقط یکی از آن‌ها با شاهد مطابقت داشت (شکل ۷) در حالی که در مورد رقم شمس هر دو نمونه جمع‌آوری شده با شاهد مطابقت داشت (شکل ۷).

در نهایت گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس ترکیب‌های مختلف از

### منابع

- Albuquerque H.Y.G., Oliveira E.J., Brito A.C., Andrade L.R.B., Carmo C.D., Morgante C.V., Vieira E.A., Moura E.F., and Faleiro F.G. 2019. Identification of duplicates in cassava germplasm banks based on single-nucleotide polymorphisms (SNPs). *Scientia Agrocola* 76(4): 328-336.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2018. FAOSTAT statistical database. Rome, FAO.
- Gross B.L., Volk G.M., Richards M.Ch. Forsline P.L., Fazi, G., and Chao T. 2012. Identification of "Duplicate" Accessions within the USDA-ARS National Plant Germplasm System Malus Collection. *Journal of American Society for Horticultural Science* 137(5): 333-342.
- Gürcan K., Öcal N., Yılmaz K.U., Ullah S., Erdoğan A., and Zengin Y. 2015. Evaluation of Turkish apricot germplasm using SSR markers: Genetic diversity assessment and search for Plum pox virus resistance alleles. *Scientia Horticultura* 193: 155-164.
- Hormaza J.I. 2002. Molecular characterization and similarity relationships among apricot (*Prunus armeniaca* L.) genotypes using simple sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics* 104(3): 321-328.
- Janatizadeh A., Fatahimoghadam M.R., Zamani Z., and Zeraatgar H. 2011. Study of genetic diversity in some apricot cultivars and genotypes using morphological and RAPD Markers. *Journal of Iranian Horticultural Science* 42(3): 255-265.
- Khadari B., Breton C., Moutier N., Roger J.P., Besnard G., Berville A., and Dosba F. 2003. The use of molecular markers for germplasm management in a French olive collection. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 521-529.
- Khadiji-Khub A., Yarahmadi M., Jannatizadeh A., and Ebrahimi A. 2015. Genetic relationships and diversity of common apricot (*Prunus armeniaca* L.) based on simple sequence repeat (SSR) markers. *Biochemical and Systematic Ecology* 61: 366-371.
- Layne R.E.C., Bailey C.H., and Hough L.F. 1996. Apricots. P. 79-111 In: Janick, J., Moore, J.N. (Eds.), *Fruit Breeding: Tree and Tropical Fruits*, vol. II. John Wiley and Sons, New York.
- Maghuly F., Fernandez E.B., Ruthner S., Pedryc A., and Laimer M. 2005. Microsatellite variability in apricots (*Prunus armeniaca* L.) reflects their geographic origin and breeding history. *Tree Genetics and Genomes* 1(4): 151-165.
- Mohamadzadeh S., Bouzari N., and Abdosi V. 2013. Evaluation of pomological, morphological and genetic characteristics in some Iranian apricot cultivars and genotypes. *Journal of Iranian Horticultural Science* 44(2): 179-191.
- Naghavi M.R., Ghareyazi B., Hosseini Salekdeh Gh. 2013. *Molecular Markers*. University of Tehran Press. Tehran. (In Persian)
- Pedryc A., Ruthner S., Hermán R., Krska B., Hegedús A., and Halász J. 2009. Genetic diversity of apricot revealed

- by a set of SSR markers from linkage group G1. *Scientia Horticultura* 121(1): 19–26.
14. Raji R., Jannatizadeh A., Fattahi R., and Esfahlani M.A. 2014. Investigation of variability of apricot (*Prunus armeniaca* L.) using morphological traits and microsatellite markers. *Scientia Horticultura* 176: 225–231.
  15. Rehder A. 1967. *Manual of Cultivated Trees and Shrubs Hardy in North America: Exclusive of the Subtropical and Warmer Temperate Regions*, 2<sup>nd</sup> Eds Macmillan, NewYork.
  16. Saghai-Marooif M.A., Soliman K.M., Jorgensen R.A., and Allard R.W. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81: 8014–8019.
  17. Sánchez-Pérez R., Ruiz D., Dicenta F., Egea J., and Martínez-Gómez P. 2005. Application of simple sequence repeat (SSR) markers in apricot breeding: molecular characterization, protection, and genetic relationships. *Scientia Horticultura* 103(3): 305–315.
  18. Tautz D. 1989. Hyper-variability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* 17(16): 6463–6471.
  19. Tian-Ming H., Xue-Sen C., Zheng X., Jiang-Sheng G., Pei-Jun L., Wen L., Qing L., and Yan W. 2006. Using SSR markers to determine the population genetic structure of wild apricot (*Prunus armeniaca* L.) in the Ily Valley of West China. *Genetic Resources and Crop Evolution* 543: 563–572.
  20. Trujillo I., Ojeda M.A. Urdiroz N.M., Potter D., Barranco D., Rallo L., and Diez C.M. 2013. Identification of the worldwide olive germplasm bank of Córdoba (Spain) using SSR and morphological markers. *Tree Genetics and Genomes* 10: 141-155.



## Screening of some Iranian Commercial Apricot Cultivars by SSR Markers for Identification of Synonyms

M. Rezaei<sup>1\*</sup>- M. Rahmati<sup>2</sup>- A.R. Kavand<sup>3</sup>- M. Hemati<sup>4</sup>- S.R. Kazemi<sup>5</sup>

Received: 01-12-2019

Accepted: 21-04-2021

**Introduction:** Apricot (*Prunus armeniaca* L.) as an important fruit crop belongs to the Amygdaloideae in the Rosacea family and is grown in regions with Mediterranean climates in the world. Apricot species were classified into six eco-geographical groups including: Central Asian, East Chinese, North Chinese, Dzhungar-Zailij, Irano-Caucasian and European. Iranian genotypes which belong to the Irano-Caucasian group are mostly self-incompatible with low chill requirement. The high level of genetic diversity in Iranian apricots is due to sexual reproduction by seeds during the years. In Iran, many of apricot local varieties have been relocated between provinces and subsequently, in some cases their names, have been changed over the years. Hence, to determine the genetically different cultivars and detection of synonyms, screening of apricot germplasm seems necessary in Iran.

**Materials and Methods:** Thirty eight commercial genotypes of apricot with five biological replications were collected from 14 nurseries in West Azarbaijan, East Azarbaijan, Esfahan, Semnan, Alborz, and Tehran Provinces in Iran. Additionally Orang Red apricot (Porteghali) included in the study as an outgroup sample. Also DNA sample of previously registered apricots in national list were used in this study. Young and healthy leaves of each cultivar were sampled and stored at -70 °C. Samples were powdered using mortar and pestle in presence of liquid nitrogen. CTAB extraction buffer was used for nucleic acid extraction. Quantity and quality of extracted DNA were measured by spectrophotometry and agarose gel electrophoresis.

Thermal cycles were done in Eppendorf thermocycler and the cycling program were set on one cycle of 94°C for 4 minute, 30 cycles of 94°C for 30 seconds, annealing temperature of each primer for 30 seconds and 72°C for 30 seconds followed by one cycle of 72°C for 5 minutes. PCR products were resolved on 10% polyacrylamide gels in 1x TBE buffer. GelRed (Biotium) was applied for gel staining and amplified bands were revealed by UV (300 nm). Eight SSR markers which showed more diversity were selected and scored. Polymorphic alleles were scored as one for presence and zero for absence. For detection of off types, samples were classified by Paired Group method and Euclidean algorithm in PAST software. Then the data of off-types were removed from the dataset and samples were reclassified by the method. Principal Coordinate Analysis (PCoA) was carried out using PAST software. Genetic diversity indices were evaluated in Popgene 32 software.

**Results and Discussion:** Eight SSR loci produced 124 alleles with the average 15.5 allele per locus. Nei's gene diversity and Shannon's information index were 0.32 and 0.48, respectively which showed high level of diversity in this collection. Distance matrix based on Nei's gene diversity showed that the most genetic distance (0.74) was between Askar Abadi and Zodras, Mahali Goushti Zodras and Nasiri cultivars. Clustering of samples indicated that some samples including 19 (Shahroudi), 59 (Nakhjavan), 107 (Shahroudi), 127 (Soltani), 137 (Ghavami), 144 (Tabraze) and 156 (Daneshkade) were off-types.

For identification of synonyms the off-type samples were disregarded. Cluster analysis illustrated that some local cultivars with different names had same genetic backgrounds. Thus, the names of these samples should be unified in the germplasm. Depicted graph based on first and second coordinates in PCoA demonstrated that the 38 collected groups of apricots are genetically 26 distinct cultivars and there are some duplicates in the germplasm. Results showed that three loci including UDP98-021, UDP98-409 and UDP98-411 were able to distinguish all 26 genotypes. To check the genetic identity of saplings with the same name, some cultivars including Jahangiri, Askar Abadi, Shamlou, Saltanati, Shahroudi, Shams, Tabarze and Rajab Ali were collected from two different nurseries. Surprisingly, the results showed that Nasiri, Tabraze and Shahroudi which were sampled twice from distinct nurseries and provinces, despite of identical names, had different genetic

1 and 2- Assistant Professors, Seed and Plant Certification and Registration Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

(\*- Corresponding Author Email: meh.rezaee@areeo.ac.ir)

3, 4 and 5- Researchers, Seed and Plant Certification and Registration Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

DOI: 10.22067/JHS.2021.61722.0

backgrounds.

**Conclusion:** Detected off-types among five biological replications of local varieties propagated asexually by nurseries showed that there was not sufficient attention in the selection of propagating material in the nurseries. In this context, establishment of foundation blocks by public sector and mother orchards by private sector of economy from Iranian apricot local varieties can be an effective solution so that nursery operators can provide certified propagating material for production of certified nursery stocks. Moreover, seed and plant certification and registration institute should made inspection and testing procedures in mother orchards and nurseries to ensure that propagated trees are healthy, genetically uniform and original.

**Keywords:** Cluster analysis, Germplasm management, Molecular marker, Synonym